

マスト細胞の活性化制御機構に関する研究
—亜鉛ウェーブの役割と ARF1 による活性化制御について—

2018

内田 亮太

**Molecular mechanisms of mast cell activation
in allergic reactions**

- Role of zinc wave and ARF1-mediated regulatory mechanism -

2018

Ryota Uchida

目次

はじめに	1
第1章 炎症性サイトカイン産生制御における亜鉛ウェーブの役割	
緒言	5
実験方法	7
結果	11
考察	23
小括	25
第2章 ARF1 ペプチドを用いた活性化制御機構の検討	
緒言	26
実験方法	28
結果	31
考察	39
小括	41
結語	42
引用文献	43
謝辞	47
英文要旨	49

略号一覧

Ag: antigen

AP1: activator protein 1

ARF1: ADP-ribosylation factor 1

ATP: adenosine triphosphate

BMDC: bone marrow-derived dendritic cell

C/EBP: CCAAT/ enhancer binding protein

CRE: cAMP-responsive element

CyA: cyclosporine A

DNP-HSA: dinitrophenyl-human serum albumin

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FcεRI : Fcε receptor I

FCS: fetal calf serum

G3PDH: Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase

GDPβS: guanosine-5'-(β-thio)-diphosphate, sodium salt

GEP: guanine nucleotide exchange protein

GPR39: G-protein-coupled receptor

HRP: horseradish peroxidase

IgE: immunoglobulin E

IκBα: NF-κB inhibitor α

IKK: IκB kinase

IL: interleukin

LAT: linker for activation of T cells

LDH: lactate dehydrogenase

LPS: lipopolysaccharide

LTC₄: leukotriene C₄

LTCC: L-type calcium channel

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MEF: mouse embryonic fibroblast

NF- κ B: nuclear factor- κ B

MTM: membrane trafficking motif

PCA: cutaneous anaphylaxis

PLA₂: phospholipase A₂

PI-3K: phosphoinositide 3-kinase

PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PIP₃: phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PKA: protein kinase A

PKC: protein kinase C

PTPase: protein tyrosine phosphatase

PVDF: polyvinylidene difluoride

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SDS: sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

siRNA: small interfering RNA

TLR: Toll like receptor

TNF- α : tumor necrosis factor- α

TPEN: *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine

WT: wild type

ZIP: Zrt-,Irt-like protein

Zn: zinc

ZnT: Zn transporter

はじめに

マスト細胞は皮下組織や粘膜組織に広く分布する免疫担当細胞であり、様々な炎症性物質を放出することで生体防御を担っている。体内に寄生虫などが侵入すると抗体産生細胞から Immunoglobulin E (IgE) 抗体が産生され、産生された IgE 抗体はマスト細胞の細胞膜にある Fcε 受容体 I (FcεRI) に結合する。そして、マスト細胞に結合した IgE 抗体に抗原が結合して架橋が形成されると、脱顆粒やサイトカインの産生といった炎症反応が起きる[1]。このように、マスト細胞は生体防御に関与している一方で、花粉やダニの死骸など無害な抗原にも過剰に応答することがあり、花粉症や喘息・アトピー性皮膚炎などアレルギー性疾患の原因にもなっている[2]。したがって、アレルギー性疾患を理解する上でマスト細胞の活性化機構の解明は重要である。

アレルギーとマスト細胞の関係について

1902年に Richet と Portier によって異種のタンパク質を反復投与することにより致命的な反応を起こすアナフィラキシーと呼ばれる現象が発見された。その後このようなタンパク質の反復投与による炎症反応や組織障害の研究が進み、1906年に Pirquet によってこれらの生体応答は総じてアレルギーと命名された。また、1967年にアレルギー反応を起こす際には血清中の IgE 抗体が増えることが石坂らによって見出され、この IgE 抗体がアレルギー反応において重要な役割を持つことが知られるようになった[3]。

マスト細胞は 1878年に Paul によって発見され、1947年に Rocha によってアナフィラキシー反応にマスト細胞由来のヒスタミンが関与していることが示された。そして、1970年に石坂らによってマスト細胞は IgE 抗体によってヒスタミンおよび遅発性アレルギー関係物質を放出することが報告された[2,3]。

このようにマスト細胞はアレルギー反応の実行役として認知されており、マスト細胞の活性化制御機構についての研究が精力的に行われている。しかし、未だその機構については不明なことが多く、さらなる解明が望まれている。

マスト細胞の細胞応答および活性化機構について

マスト細胞の細胞応答は大きく脱顆粒・サイトカイン産生・脂質メディエーター産生の3つに分けられる。脱顆粒はヒスタミンなどの起炎物質を含む顆粒を細胞外へ放出する反応であり、アナフィラキシー反応のような即時型アレルギーに関与している[4,5]。一方、サイトカイン産生は接触性皮膚炎のような遅発型アレルギーに関与している。また、脂質メディエーターの産生は喘息などに関与している。マスト細胞には **FcεRI** が発現しており、**FcεRI** に **IgE** 抗体が結合し抗原が **IgE** 抗体に結合することで架橋刺激が入り、活性化されて上記の細胞応答を行う。

架橋刺激によって **FcεRI** から生じたシグナルはチロシンキナーゼである **Lyn** や **Fyn** に伝えられ、**Lyn** からアダプター分子である **linker for activation of T cells (LAT)** を介していくつかのシグナル伝達物質を経て **IκB kinase (IKK)** が活性化され、**NF-κB** などのサイトカイン転写因子が活性化される[6]。しかし、近年サイトカインの転写活性化には、転写因子の活性化に加えて亜鉛シグナルの一種である亜鉛ウェーブが重要であることが明らかとなりつつある[7]。

また、**Fyn** に伝えられたシグナルは **PI-3K** を経て低分子量 G タンパク質である **ARF1** を活性化させることが報告されている。**ARF1** は顆粒の移行に関与していることが示されており、脱顆粒に重要であることが示唆されている[8]。

しかしながら、サイトカイン転写における亜鉛シグナルおよび、脱顆粒の際の顆粒移行における **ARF1** の役割やシグナル伝達機構について、十分には明らかにされていない。そこで、本研究ではこれらのシグナル機構に焦点を当てた。

亜鉛シグナルについて

細胞レベルでの亜鉛の動態は主に亜鉛トランスポーター、陽イオンチャネルおよび金属結合タンパク質であるメタロチオネインによって調節されている[9-12]。亜鉛トランスポーターは ATP を利用しない二次性能動輸送型の solute carrier transporter 群 (SLC ファミリー) に属し、細胞質から細胞外や細胞小器官内に亜鉛を輸送する Zn transporter (ZnT) と細胞質内に亜鉛を輸送する Zrt-,Irt-like protein (ZIP) に大別される[13,14]。ヒトでは 9 種類の ZnT が存在し、ZIP は 14 種類存在している。一方、これらに加えて亜鉛透過性の陽イオンチャネルとして NMDA 受容体や AMPA 型グルタミン酸受容体、カイニン酸型グルタミン酸受容体、L 型カルシウムチャネルなどが知られている [12]。亜鉛はカルシウムのようなシグナル伝達物質としての役割を有することが明らかとなりつつあり、亜鉛シグナルに関係しているトランスポーターや陽イオンチャネルがいくつか報告されている。2000 年に神経系の分野においてプレシナプスからカルシウムイオンと共に亜鉛イオンが放出され、AMPA 型グルタミン酸受容体またはカイニン酸型グルタミン酸受容体を介してポストシナプスに入り、ポストシナプスのアポトーシスを誘導する機構が報告された[15]。これにより、亜鉛が細胞外シグナル伝達物質としての役割を有することが知られるようになった[16-21]。また、2007 年に免疫担当細胞であるマスト細胞において、抗原刺激依存的に細胞質内の亜鉛イオン濃度が上昇する亜鉛ウェーブと呼ばれる細胞内亜鉛シグナルの機構が見出された [7]。その後、免疫担当細胞である T 細胞の活性化において、T 細胞受容体シグナル経路のシグナル伝達物質である Snail タンパク質の核移行に亜鉛トランスポーターである ZIP6 を介した亜鉛イオンの放出が関与していることが報告される[22]など、様々な亜鉛シグナルの機構が示されている。このように亜鉛は酵素反応のみならず、シグナル伝達物質としても重要であることが示唆されている。

カルシウムチャネルと亜鉛ウェーブの関係について

カルシウムチャネルはカルシウムイオンを選択的に透過するイオンチャネルとして発見されたが、亜鉛を透過することも報告されている[12,23]。また、電位依存性のカルシウムチャネルは開口電位の違いなどから L 型・P/Q 型・N 型・R 型・T 型に分類される。L 型カルシウムチャネル (LTCC) は主に筋細胞や神経細胞、内分泌細胞などの細胞膜に発現しており、細胞外からのカルシウムの取り込みに関与している[24]。興味深いことに、マスト細胞における LTCC は小胞体の膜上に発現しており、亜鉛ウェーブに関与していることが示されている[34]。しかし、亜鉛ウェーブの機構は LTCC の活性化経路を含めて不明なことが多い。

ARF1 について

ARF1 とは ADP リボシル化因子 1 (ADP-ribosylation factor 1) の略称であり、コレラ毒素による ADP リボシル化活性を促す因子として発見された[25-27]。Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質のひとつであり、生体内においては細胞骨格の制御や小胞輸送、リン脂質の代謝などに関与していることが示されている[28-33]。マスト細胞においては、脱顆粒の際の顆粒移行に関与していることが示されているが[8]、その詳細な機構についてはいまだ明らかになっていない。

以上より、マスト細胞のシグナル制御機構に関しては十分には明らかにされておらず、更なる解明が望まれる。そこで、本研究では、マスト細胞の活性化メカニズム解明の一環として、第一章ではサイトカイン産生における亜鉛シグナルについて検討を行い、第二章では脱顆粒における顆粒移行に重要とされる ARF1 に焦点を当て、その役割・重要性について検討を行った。

第一章

炎症性サイトカイン産生制御における亜鉛ウェーブの役割

緒言

これまでに免疫担当細胞の一種であるマスト細胞において、FcεRI 刺激によって細胞質内亜鉛濃度が 5~15 分程度で上昇する現象が見出され、この現象は亜鉛ウェーブと名付けられた[7]。亜鉛ウェーブは細胞内亜鉛シグナルの一種であり、サイトカインの転写をポジティブに制御している。また、亜鉛ウェーブは小胞体から生じており、小胞体膜上に発現している LTCC によって制御されていることが示されている (図 1) [34]。加えて、亜鉛ウェーブの役割として、サイトカインの転写因子である NF-κB (nuclear factor-κ B) に亜鉛を供給することで NF-κB の DNA との結合能を増強することが示唆されている[34]。しかしながら、マスト細胞では FcεRI 刺激の他に、Toll 様受容体 4 (TLR4) 刺激や種々のサイトカイン刺激によってもサイトカイン産生が行われるが[2]、TLR4 やサイトカイン受容体のシグナル経路における亜鉛ウェーブの関与については検討されていなかった。そこで、亜鉛ウェーブの制御機構解明の一環として、第一章では FcεRI 刺激以外のシグナル経路においても亜鉛ウェーブが関与しているのかを検討した。

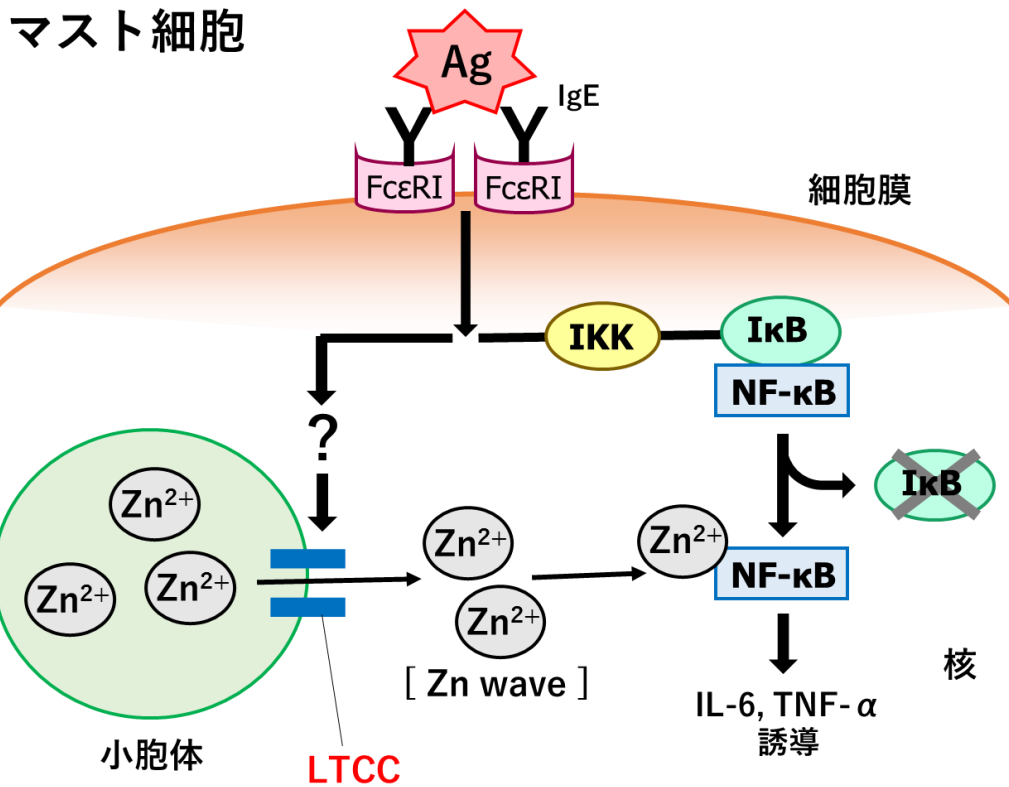


図 1. マスト細胞における亜鉛ウェーブのシグナル経路

FcεRI に結合した状態の IgE に抗原(Antigen: Ag)が結合することで FcεRI からシグナルが開始される。また、サイトカイン転写因子である NF-κB は IKK を介した経路によって活性化することが知られている。亜鉛ウェーブによって放出された亜鉛は NF-κB に配位することで NF-κB の転写活性を増強させていると考えられている。なお、FcεRI から LTCC に至るまでの経路については現時点で不明である。

実験方法

試薬類と抗体

ニカルジピン (145-06381) および TPEN (340-05411) は和光純薬工業から購入した。ウエスタンブロッティングの一次抗体として抗 I κ B α (Cell Signaling, 9242S)、抗 pERK1/2 (Promega, V803A)、抗 ERK1 / 2 (Promega, V114A)、抗 α -チューブリン (Sigma-Aldrich, T5168) を用いた。

マウス

C57BL / 6J および BALB / c マウスは日本 SLC から入手した。マウスは、特定の病原体のない条件下で維持され、8~12 週齢の間で分析に用いた。本実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守し、当大学動物実験委員会の承認を得て行った。

細胞培養

マウス骨髄由来マスト細胞 (マスト細胞) は、BALB/c マウスから骨髄を採取し 10% のウシ胎児血清 (FCS) 入り RPMI1640(Wako, 189-02025) に IL-3 産生 CHO 細胞の培養上清を加えて、37 °C \cdot 5%CO₂ \cdot 95%加湿条件で 4~5 週間培養したものを使用した。

マウス骨髄由来樹状細胞 (樹状細胞) は、10%FCS を含む RPMI 1640 にコロニー刺激因子 (GM \cdot CSF) (20 ng / mL, PEPRO TECH, AF - 315-03)、または GM \cdot CSF 産生 CHO 細胞の培養上清を加えた培地中で 37 °C \cdot 5%CO₂ \cdot 95%加湿条件により骨髄細胞から樹状細胞へ分化させた。6~8 日目に回収し、CD11c + DC を抗 CD11c mAb 結合ビーズを含む IMag Cell Separation System または FACS Aria (BD) によって単離した。

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーにより、マスト細胞内亜鉛の量を測定した。マスト細胞に 2 μ M になるように Newport Green DCF ジアセテート(Thermo Fisher Scientific, N7991) (以下、Newport Green と呼ぶ)を加えて 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートし、10 ng/ml の DNP-HSA で 37 $^{\circ}$ C \cdot 15 分間、0.1 μ g/ml の LPS または 10 ng/ml の IL-33 で 37 $^{\circ}$ C \cdot 30 分間刺激した。また、それぞれの刺激に対して、100 μ M のニカルジピンで前処理したものと未処理のものを用意した。刺激後、蛍光強度を FACSCaliburTM flow cytometer (BD) で測定した。

ELISA

BD OptEIATM ELISA Sets(BD, 555240)を用いてプロトコールに沿って行った。

リアルタイム PCR

マスト細胞を Sepasol RNAI (Nacalai Tesque, 09379-55)を用いてホモジナイズし、RNA の抽出はプロトコールに沿って行った。cDNA の合成は RNA サンプルに逆転写酵素として ReverTra Ace(Toyobo, TRT-101)、primer として oligo(dT)primer (Life Technologies Corporation, 58862)、そして基質を加えて 30 分間 42 $^{\circ}$ C でインキュベートした。II-6 の転写率は SYBR[®] Green reagent (TaKaRa, RR820A)を用いて、*g3pdh* の相対値として測定した。Primer は TaKaRa から購入した。II-6 の forward primer は 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3'、reverse primer は 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'を用いた。*g3pdh* の forward primer は 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGCCG-3'、reverse primer は 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'を用いた。

ルシフェラーゼリポーターアッセイ

pGL4/NF- κ B プロモーターベクター (Promega, E8491) および phRL-TK ベクター (Promega, E2241) を two-step electroporator NEPA21(Nepa Gene)を用いてマスト細胞に導入した。トランスフェクション 24 時間後に採取し、DNP-HSA で 6 時間刺激した。ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, E1910)を用い、推奨プロトコールに沿って測定した。

ウェスタンブロッティング

マスト細胞をライシスバッファー (20 mM トリス-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1%NP-40、プロテアーゼ阻害剤 (Roche, 04 693 116 001)) 中、4 °C で 30 分間冷却しながら溶解し、12,000 ×g、4 °C で 30 分間遠心後、上清を採取して SDS を加えサンプルとした。サンプルは、5~20% 勾配ポリアクリルアミドゲル (Wako, 197-15011) を用いて SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore, IPVH00010) にトランスファーした。PVDF 膜を一次抗体とともに室温で 1 時間インキュベートした。次いで、PVDF 膜を HRP 結合抗マウス (Thermo Fisher Scientific, 62-6520) または抗ウサギ (Thermo Fisher Scientific, 65-6120) 抗体と共に室温で 1 時間インキュベートした。PVDF 膜を十分に洗浄した後、Western Lightning-ECL システム (GE-Healthcare, RPN2232) を製造業者のプロトコールに従って使用して発光させ、PVDF 膜を富士 RX フィルム (Fuji, RX-U) に暴露又は、LAS-4000 蛍光画像分析装置 (Fujifilm) を用いて測定および分析を行った。

敗血症モデルマウスの作製

敗血症は BALB/c マウスを用いて、LPS (0.5 mg/kg) の腹腔内投与によって誘発した。注入 1 時間後にペントバルビタール溶液で麻酔し、血液を腹部大動脈から直接採取し、血漿画分を遠心分離 (5200 rpm、2 分、室温) によって回収した。

LDH アッセイ

細胞毒性は培地中への LDH 放出量を測定することで評価した。マスト細胞 1×10^6 cells/mL を 1 時間ニカルジピンで処理したものと未処理のものを用意し、それぞれの上清をサンプルとした。LDH の活性は Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo Laboratories, CK12) を用いて、プロトコールに沿って測定した。

統計学的分析

統計解析ソフト IBM SPSS Statistics を用いて、Tukey の検定または Student の t 検定を行い、統計学的に分析し、p 値が 0.05 未満の場合にデータは統計的に有意であるとみなした。

結果

マスト細胞において、亜鉛ウェーブは TLR4 および IL-33 受容体の刺激で誘導される

これまで、マスト細胞において FcεRI 刺激が亜鉛ウェーブを誘導し、亜鉛ウェーブは小胞体膜上の LTCC によって調節されることが示されている。本研究ではまず、TLR4 や IL-33 受容体などの様々な受容体刺激に応答して細胞質内遊離亜鉛の濃度が変化するかを検討した。細胞質内亜鉛濃度の変化は、亜鉛蛍光プローブである Newport Green を用いて調べた。図 2A に示すように、FcεRI 刺激 15 分後においてマスト細胞における細胞質内亜鉛濃度の上昇が確認できた。そして、LTCC アンタゴニストであるニカルジピンはこの上昇を有意に抑制した。同様に、30 分間の TLR4 および IL-33 受容体刺激においても亜鉛濃度の上昇が見られ、ニカルジピン処置によって有意に抑制された (図 2B-C)。これらの結果は、TLR4 およびサイトカイン受容体刺激によって亜鉛ウェーブが誘導されることを示している。

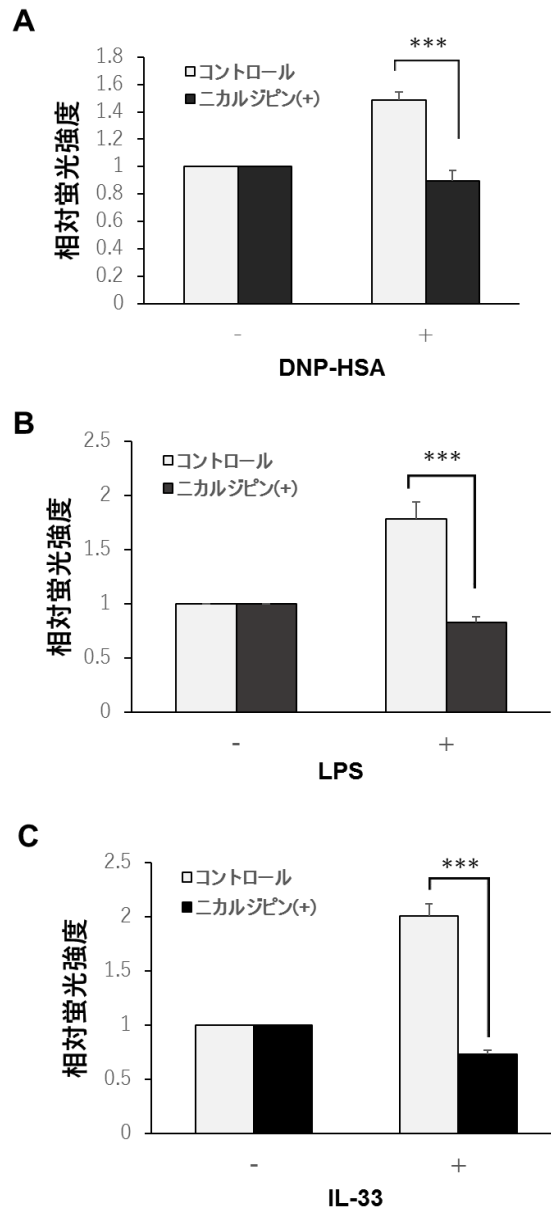


図 2. FcεRI、TLR4 および IL-33 受容体刺激による亜鉛ウェーブの誘導
 10 ng/ml の DNP-HSA 刺激の 15 分後 (A)、0.1 μg/ml の LPS 刺激の 30 分 (B) および 10 ng/ml の IL-33 刺激の 30 分後 (C) の細胞質内亜鉛濃度を、蛍光亜鉛プローブ Newport Green を用いて調べた。また、100 μM のニカルジピンで 30 分間前処置した場合においても同様に行った。データは、Newport Green の相対蛍光強度を表す。*** p < 0.001、Student の t 検定。

TLR4 および IL-33 受容体刺激によるサイトカイン産生に亜鉛ウェーブが関与している

マスト細胞において、FcεRI、TLR4、および IL-33 受容体刺激は、IL-6 および TNF-α などのサイトカイン産生を誘導することができ、これらのサイトカインは炎症反応およびアレルギー反応に関与する。亜鉛ウェーブがこれらのサイトカイン産生に影響を及ぼすかを調べるために、マスト細胞における FcεRI、TLR4 および IL-33 受容体依存性のサイトカイン産生また転写に対するニカルジピンおよび亜鉛キレーター TPEN の影響を調べた。マスト細胞をニカルジピン処理することで、FcεRI、TLR4 および IL-33 受容体依存性の IL-6 産生がそれぞれ用量依存的に抑制された。さらに、亜鉛キレーターである TPEN を用いてマスト細胞のサイトカイン産生における亜鉛の関与を調べた。その結果、FcεRI 依存性 IL-6 産生は、TPEN 処理されたマスト細胞において有意に抑制され、この過程において亜鉛が必要であることが示された。同様の結果が、TLR4 および IL-33 受容体依存性サイトカイン産生においても得られた (図 3)。これらの結果は、亜鉛ウェーブがマスト細胞における FcεRI、TLR4 および IL-33 受容体依存性のサイトカイン産生にそれぞれ関与することを示している。また、ニカルジピン 12 時間処置により放出された LDH の量に有意な変化は観察されなかったため、ニカルジピンによる細胞毒性の影響はなかった (図 4)。

次に TLR4 および IL-33 受容体依存性の IL-6 の産生過程における転写の段階に亜鉛ウェーブが関与しているかを調べた。その結果、ニカルジピン処置および TPEN 処置により IL-6 の転写率が有意に抑制され、FcεRI 依存性亜鉛ウェーブと同様の結果が確認された (図 5)。

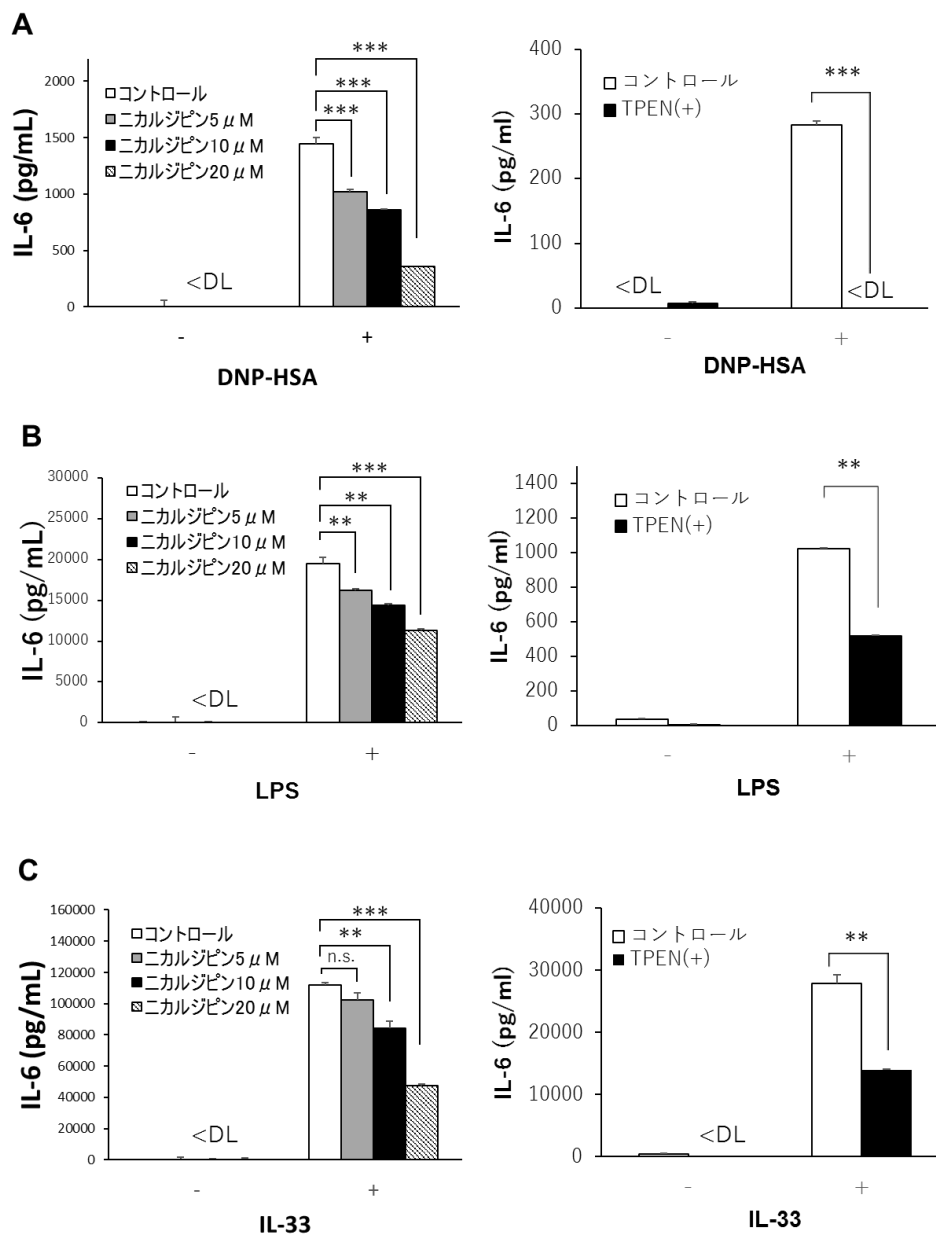


図 3. TLR4 および IL-33 受容体刺激による IL-6 産生に対するニカルジピンおよび TPEN の阻害効果

10 ng/ml の DNP-HSA で 1 時間 (A)、1 μg/ml の LPS で 6 時間 (B) および 1 ng/ml の IL-33 で 12 時間 (C) それぞれインキュベートし、IL-6 産生の産生量を ELISA によって測定した。また、5, 10, 20 μM ニカルジピンおよび 10 μM TPEN で処理した場合も同様に行った。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001、Tukey の検定、Student の t 検定。検出限界以下、<DL, below detection limit

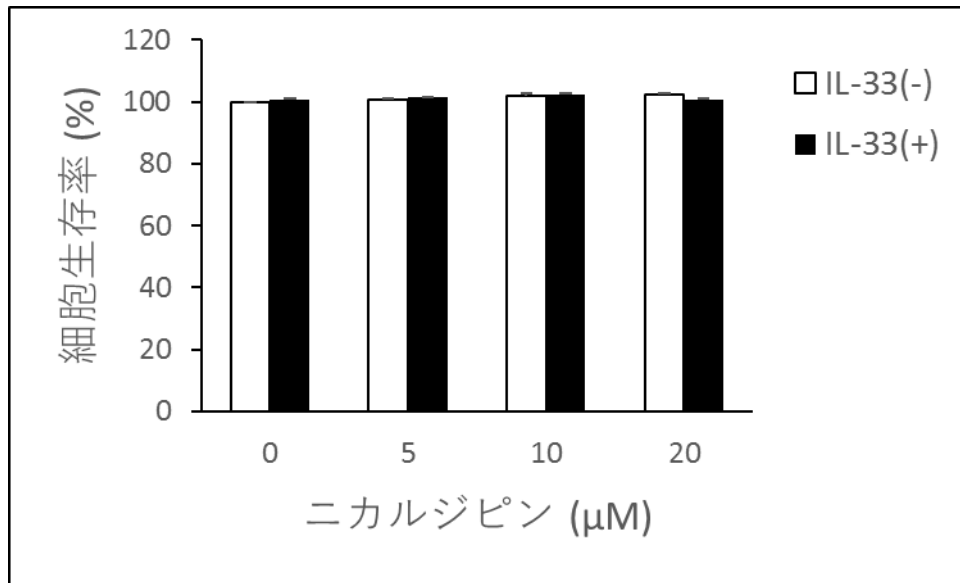


図 4. ニカルジピンによる細胞毒性の評価

ニカルジピンによるマスト細胞の活性抑制作用が細胞毒性によるものかどうかを調べた。グラフは 1 ng/ml の IL-33 と同時にニカルジピンを加え、12 時間インキュベートした後の培養上清中に含まれている LDH の量を元に生存率を算出した。

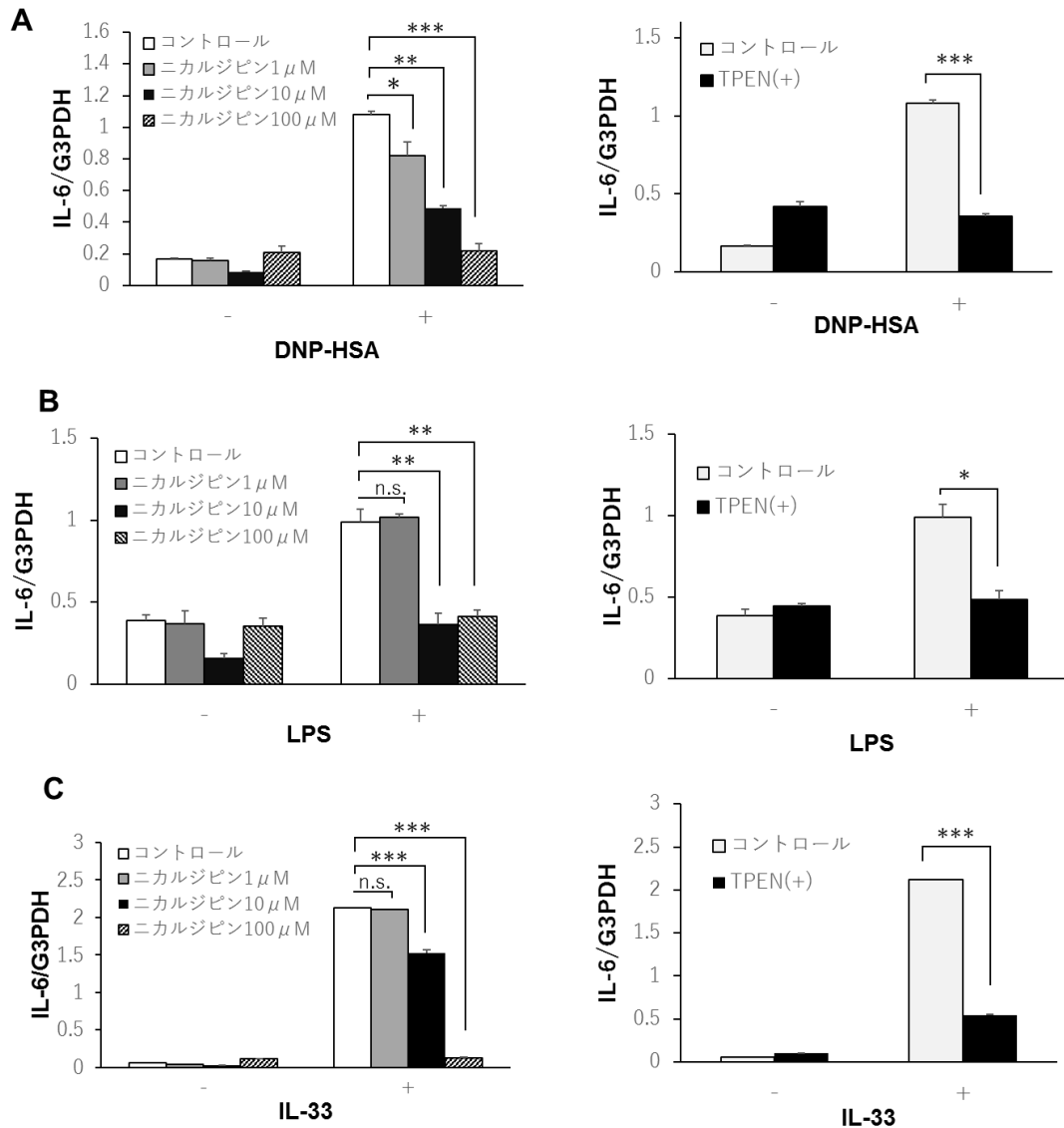


図 5. TLR4 および IL-33 受容体刺激による *IL-6* 転写に対するニカルジピンおよび TPEN の阻害効果

(A) マスト細胞を 1,10,100 μM のニカルジピンおよび 10 μM の TPEN で 30 分前処理し、10 ng/ml DNP-HSA で 1 時間刺激後、FcεRI 依存性の *IL-6* の転写率を定量的 RT-PCR により測定した。(B) A と同様の実験を 1 μg/ml の LPS 刺激で行い、TLR4 依存性 *IL-6* 転写率を測定した。(C) A と同様の実験を 1 ng/ml の IL-33 刺激で行い、IL-33 受容体依存性 *IL-6* 転写率を測定した。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001、Tukey の検定、Student の t 検定。

亜鉛ウェーブはマウス由来樹状細胞における TLR4 依存性サイトカイン産生に關与する

亜鉛ウェーブが LPS によって誘導されることが示されたため、自然免疫に關与している他の免疫担当細胞においても亜鉛ウェーブの経路が存在している可能性を考えた。そこで、樹状細胞を用いて亜鉛ウェーブの關与について調べた。図 6A に示すように、LPS は樹状細胞において 2 時間後に亜鉛ウェーブを誘発し、Newport Green シグナルの上昇は、ニカルジピン処理によって有意に抑制された。この結果と一致して、LPS 誘導性 IL-6 産生もニカルジピンおよび TPEN 処理によって抑制され、*IL-6* 転写においてもニカルジピンおよび TPEN 処理によって抑制されることが確認された(図 6B-C)。これらの結果から、亜鉛ウェーブはマスト細胞だけではなく樹状細胞においても誘導され、サイトカイン産生に關与していることが示唆された。

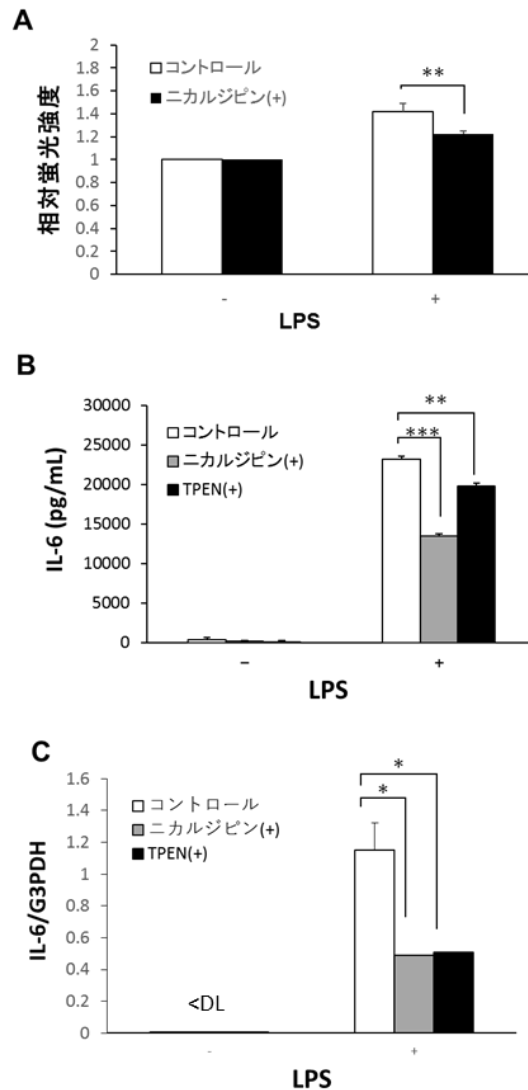


図 6. 樹状細胞における亜鉛ウェーブのサイトカイン転写制御

(A) 1 $\mu\text{g/ml}$ の LPS で 2 時間刺激後の細胞内亜鉛濃度を、10 μM ニカルジピンで前処理した場合および無処理の場合において調べた。データは、Newport Green の相対蛍光強度を示している。(B) 10 μM のニカルジピンまたは 0.1 μM の TPEN による前処理を行った場合および無処理の場合での、樹状細胞における 1 $\mu\text{g/ml}$ の LPS 刺激の 3 時間後の IL-6 産生のレベルを ELISA によって測定した。(C) 10 μM のニカルジピンまたは 0.1 μM の TPEN 前処理および無処理の場合での、1 $\mu\text{g/ml}$ の LPS 3 時間刺激による *IL-6* 転写率を、定量的 RT-PCR によって決定した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、Tukey の検定、Student の t 検定。検出限界以下、<DL, below detection limit

亜鉛ウェーブは I κ B 非依存的経路で NF- κ B シグナル伝達経路に関与する

マスト細胞における IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインの発現調節には NF- κ B 活性化経路が必要であることから、亜鉛ウェーブが NF- κ B の活性化に必要であるかどうかを検討した。NF- κ B レポーター遺伝子を導入したマスト細胞を用いてルシフェラーゼレポーターの測定を行った。図 7A に示すように、NF- κ B の Fc ϵ RI 依存性レポーター活性は、ニカルジピン処理されたマスト細胞において有意に抑制され、亜鉛ウェーブが NF- κ B 経路の活性化を調節することが判明した。次に、NF- κ B の核局在化を調節する I κ B α の分解に対するニカルジピンの効果を調べた。マスト細胞において、Fc ϵ RI 刺激は、I κ B の分解および MAPK の活性化を時間依存的に誘導した (図 7B, C)。しかし予想に反して、ニカルジピンによる亜鉛ウェーブの阻害は、Fc ϵ RI 誘導性の I κ B 分解に影響しなかった (図 7B, D)。これらの結果は、亜鉛ウェーブが I κ B 非依存的に Fc ϵ RI 媒介 NF- κ B シグナル伝達経路に関与することを示唆した。

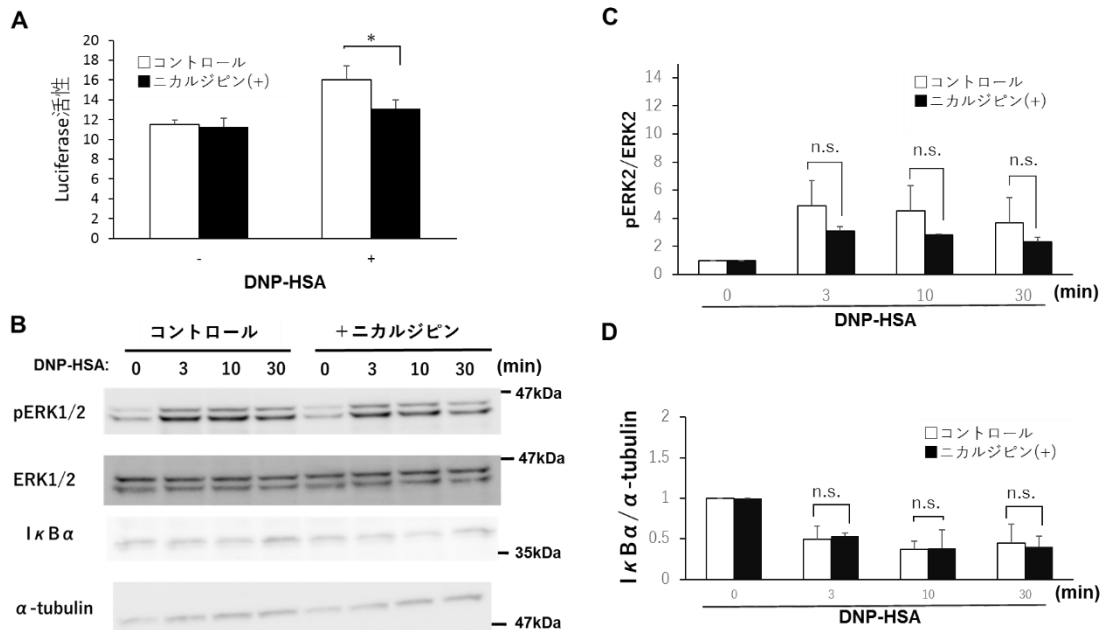


図 7. 亜鉛ウェーブの NF-κB シグナル伝達経路への作用

(A) マスト細胞を用いて、ニカルジピン処理した際の FcεRI 刺激に対する NF-κB の活性への影響を、ルシフェラーゼレポーターアッセイによって調べた。マスト細胞に NF-κB/Luc プラスミド DNA および pRL-TK プラスミド DNA を電ポレーションにより導入した。結果は Renilla ルシフェラーゼに対して標準化した。(B) (C) (D) ERK1/2 リン酸化および IκBα の分解を調べた。抗原刺激後、細胞を溶解したサンプルを抗 p-ERK または抗 IκBα 抗体でプロットした。結果は非リン酸化 ERK または α-チューブリンに対して標準化した。* p < 0.05、Student の t 検定。

亜鉛ウェーブは生体内における LPS 介在性サイトカイン産生調節の役割を果たす可能性が高い

サイトカインが強力に誘導されるマウス敗血症モデルを用いて、*in vivo*でのサイトカイン産生に対するニカルジピンの阻害効果を調べた。マウスに生理食塩水またはニカルジピン (50 mg/kg) を 3 日間連続して腹腔内注射し、3 日目に生理食塩水またはニカルジピンによる最後の注射後、LPS (0.5 mg/kg) を注射した。血清中のサイトカインの濃度は ELISA で測定した。図 8 に示すように、LPS 注射 1 時間後の TNF- α の血清レベルは、ニカルジピン投与マウスにおいて有意に抑制された。この結果は、亜鉛ウェーブが *in vivo*においても LPS 誘導性サイトカイン産生に役割を果たす可能性を示唆した。

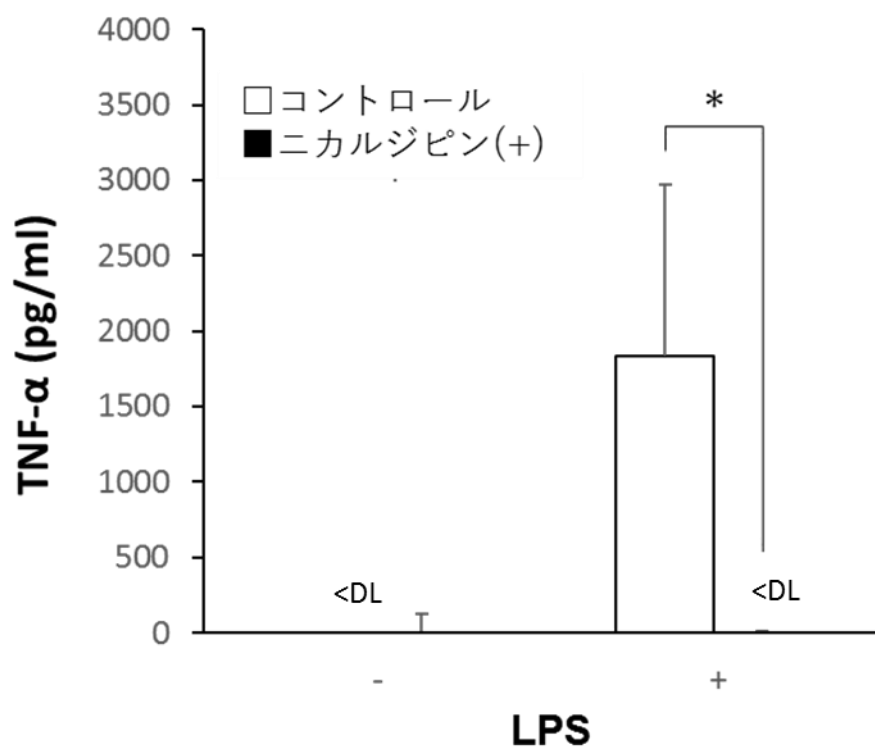


図 8. *in vivo*での敗血症モデルに対するニカルジピン治療の効果

コントロールまたは 50 mg/kg ニカルジピン処置マウスに 0.5 mg/kg LPS を腹腔内投与し、1 時間後の血清中 TNF- α 濃度を測定した。* $p < 0.05$ 、Student の t 検定。検出限界以下, <DL, below detection limit

考察

今回の研究では、マスト細胞がサイトカインを産生する経路について下記の3点に着目した。1つ目はマスト細胞や好塩基球に特異的な **FcεRI** を介した経路であり、細胞膜上に発現している **FcεRI** に **IgE** 抗体が結合し、さらに **IgE** 抗体の抗原が結合することで惹起される。この経路では、サイトカイン産生の他に脱顆粒や脂質メディエーターの分泌が行われ、寄生虫感染の際に活性化される[1]。2つ目は自然免疫に関与している **TLR** を介した経路であり、この経路において脱顆粒は起こらないが、強力にサイトカインを誘導することが知られている[35]。3つ目はサイトカイン受容体を介した経路であり、今回用いた **IL-33** は、組織修復を促す役割を有する他、好酸球や **Th2** を活性化してアレルギー反応を誘導することが知られている[36,37]。また、**IL-33** 刺激を受けたマスト細胞においては **IL-2** の産生を促し、**IL-2** によって制御性 **T** 細胞を活性化させる機構が報告されている[38]。これら3つのシグナル経路において産生されるサイトカインの種類は様々であり、それぞれ異なるシグナル経路で調節されていると考えられる[39]。これまでは、亜鉛ウェーブという新たな亜鉛シグナルに関して **FcεRI** を介する経路における研究がなされていたが、その詳細な機構は不明であった。今回の研究によって、**TLR4** および **IL-33** 受容体由来のシグナル経路における亜鉛ウェーブの関与について明らかになったことにより、炎症反応における亜鉛シグナルの役割について理解が進むものと思われる。

亜鉛ウェーブが **TLR** のシグナル経路に関与しているという結果から、自然免疫担当細胞においても亜鉛ウェーブの存在が考えられたため、今回樹状細胞を用いて亜鉛ウェーブについて検討を行った。その結果、樹状細胞においても亜鉛ウェーブが存在することが示されたため、**TLR** を発現しているその他の細胞においても亜鉛ウェーブの機構が存在している可能性が示された。

亜鉛ウェーブの機構について先行研究ではベラパミルを用いて実験が行われていた。しかし、当研究の過程において亜鉛ウェーブにおける様々な LTCC 遮断薬の効果を比較したところ、ベラパミルに比べてニカルジピンの作用が極めて強力であることが分かった。そこで、ニカルジピンを用いて、NF- κ B 活性化への影響をリポーターアッセイにより検討した。その結果、ニカルジピンは NF- κ B の活性を抑制することが示された。しかし、ウェスタンブロッティングの結果において I κ B の分解に影響がないことから、IKK 複合体を介した活性化経路には影響していないことが確かめられた。これらの結果は、亜鉛ウェーブの標的として I κ B の分解された後の NF- κ B に作用している可能性を示唆するものであった。

敗血症モデルを用いた解析の結果から、LTCC 遮断薬であるニカルジピン投与によって LPS 誘発性の TNF α の産生がほぼ刺激無しのレベルまで抑制された。生体内にはマスト細胞以外でマクロファージなどのサイトカイン産生細胞が存在しており、今回の結果は複数種のサイトカイン産生細胞において LTCC を介したサイトカイン産生調節機構が存在する可能性を提示した。

小括

第一章では細胞内亜鉛シグナルの一種である亜鉛ウェーブに関する新たな知見について述べた。マスト細胞において見出された亜鉛ウェーブは FcεRI 刺激によるサイトカイン産生を調節していることが報告されていたが、本研究は TLR やサイトカイン受容体刺激によっても同様に亜鉛ウェーブが生じることを示した。また、マスト細胞の他に樹状細胞においても亜鉛ウェーブの存在を確認した。これらの結果は、亜鉛ウェーブがマスト細胞のみではなく様々なサイトカイン産生細胞で見られるシグナル機構である可能性を提示した。

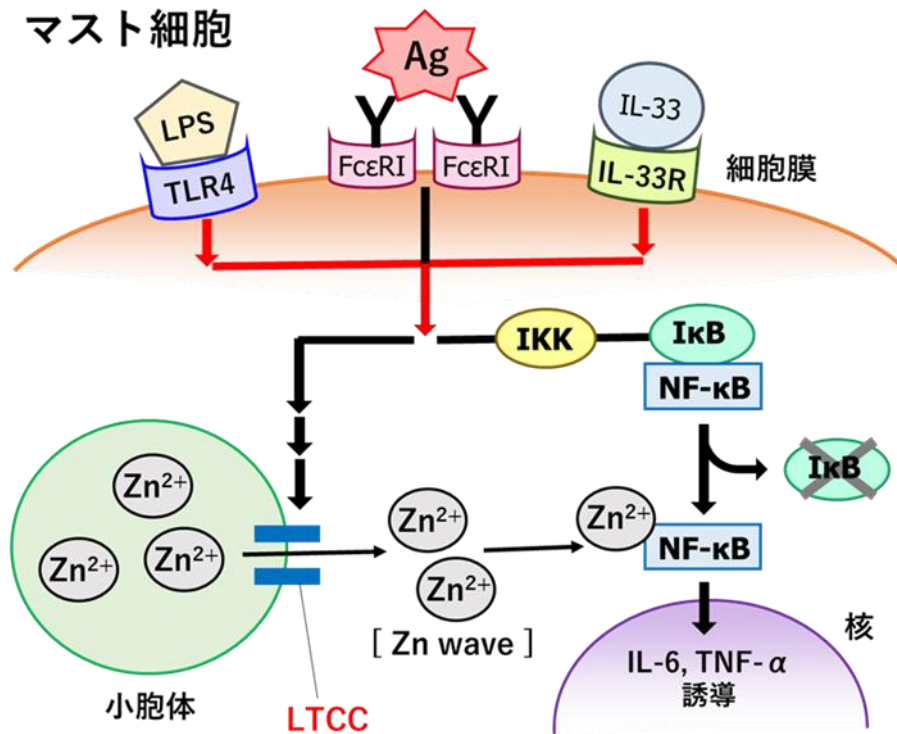


図 8. 亜鉛ウェーブの新たなシグナル経路

これまで FcεRI 由来のシグナル経路において亜鉛ウェーブが関与していると考えられてきたが、TLR4 や IL-33 受容体由来のシグナル経路においても亜鉛ウェーブは関与していることが示された。

第二章

ARF1 ペプチドを用いた活性化制御機構の検討

緒言

ARF1 の N 末端ペプチド断片である ARF1(2-17)に膜透過モチーフ (MTM) を結合させた MTM-ARF1(2-17) (ARF1 ペプチド) には、ARF1 の阻害活性があることが報告されている[40,41]。そして、マスト細胞においては FcεRI 誘導性の ARF1 活性化阻害および脱顆粒の阻害作用を有することが示されている[8] (図 1)。これらのことから、ARF1 ペプチドは抗アレルギー効果を有する可能性が考えられる。そこで第二章では、ARF1 ペプチドのマスト細胞脱顆粒阻害効果における構造活性相関および ARF1 ペプチドの抗アレルギー効果について検討した。

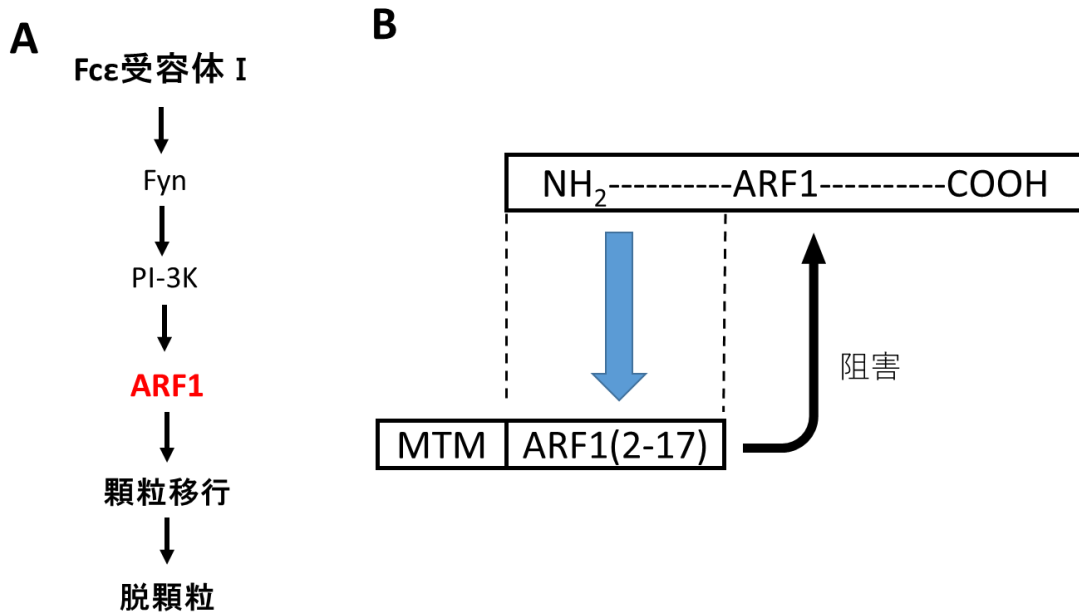


図 1. マスト細胞における ARF1 の役割と ARF1 ペプチドによる ARF1 阻害作用

(A) マスト細胞が抗原刺激を受けると FcεRI からシグナルが生じてチロシンキナーゼである Fyn が活性化する。そして、下流の PI-3K が活性化し、その後 ARF1 が活性化する。ARF1 は脱顆粒の際の顆粒移行に関与していることが示されている。(B) ARF1 の N 末端側のペプチド断片である ARF1(2-17)に膜透過モチーフ (MTM) を結合させたペプチドが ARF1 の活性化を阻害し、また、マスト細胞における脱顆粒を阻害することが示されている。

実験方法

ARF1 ペプチドの合成

Toray Research Center (神奈川、日本) において逆相または向流分配クロマトグラフィーにより、ARF1 ペプチドを合成および精製した。

マウス

C57BL / 6J および BALB / c マウスは日本 SLC から入手した。マウスは、特定の病原体のない条件下で維持され、8~12 週齢の間で分析に用いた。本実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守し、当大学動物実験委員会の承認を得て行った。

細胞培養

マウス骨髄由来マスト細胞 (マスト細胞) は、BALB/c マウスから骨髄を採取し 10% の FCS 入り RPMI1640(WAKO, 189-02025) に IL-3 を加えて、37 °C・5%CO₂・95%加湿条件下で 4~5 週間培養したものを使用した。

脱顆粒アッセイ

マスト細胞を 37 °C で 12 時間、0.5 µg/mL の IgE で感作させた。感作後、細胞を Tyrode 緩衝液 (10 mM HEPES pH7.4, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM グルコース) で 2 回洗浄し、次いで同じバッファーに懸濁し、多価ジニトロフェニルヒト血清アルブミン (DNP-HSA、BIOSEARCH TECHNOLOGIES) で 30 分間処理した。β-ヘキソサミニダーゼ反応は、上清または細胞溶解物 50 µL の各ウェルへ 1.3 mg/mL の *p*-ニトロフェニル-*N*-アセチル-D-グルコサミド (0.1M クエン酸塩、pH4.5 中) 100 µL

を加え、37 °Cで 50 分間発色させた。次に、0.2 M グリシン-NaOH (pH10.2) 150 μ L を添加することによって酵素反応を停止させ、405 nm での吸光度を Model 680 microplate reader (Bio-Rad) で測定した。細胞溶解物は 1% Triton X-100 を含有する Tyrode 緩衝液で溶解した。放出率 (%) = 上清の吸光度 / (上清の吸光度 + 細胞溶解物の吸光度) \times 100 の式により、 β -ヘキソサミニダーゼの放出率を算出した。

サイトカインおよびケミカルメディエーターの測定

細胞培養上清中の IL-6 の濃度は BD OptEIA™ ELISA Sets (BD, 555240) を用いて、LTC₄ の濃度は Leukotriene C₄ ELISA Kit (Cayman Chemical, 501070) を用いて製造者のプロトコールに従って測定した。

リアルタイム PCR 分析

細胞を Sepasol RNAI (Nacalai Tesque) でホモジナイズし、RNA は製造者のプロトコールに従って単離した。逆転写酵素 (ReverTra Ace; Toyobo) およびオリゴ (dT) primer (Invitrogen) 500 ng を含む 1 μ g の RNA から 42 °C で 30 分間 cDNA を合成した。cDNA はリアルタイム PCR によって測定した。基準遺伝子 *g3pdh* に対する *Il-6* 遺伝子発現を、SYBR® Green Reagent (TaKaRa) を用いて測定した。これらの実験で使用した primer は、Invitrogen から購入し、配列は以下の通りである：*Il-6* : forward primer、5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3' および reverse primer、5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'; G3PDH : forward primer、5'-TTCACCACCATGGAGAAGGCCG-3' および reverse primer、5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'。

受動皮膚アナフィラキシーモデルマウスの作製

BALB/c マウスを、両耳に皮下注射した 0.5 μg の IgE で 12 時間または一晩感作させた。次に、生理食塩水または MTM-ARF1 (8-16) ペプチドを腹腔内注射した。30 分後、多価ジニトロフェニル・ウシ血清アルブミン (DNP-BSA) (Cosmo Bio Co., LTD) 250 μg およびエバンスブルー色素 (Sigma-Aldrich) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を生理食塩水に溶かし尾静注した。耳のエバンスブルーの浸潤を 30 分間モニターし、両耳の組織からエバンスブルーをホルムアミド 700 μL 中 63 $^{\circ}\text{C}$ で一晩抽出した。ホルムアルデヒドで抽出したエバンスブルーの吸光度を 620 nm で測定した。

乳酸脱水素酵素 (LDH) アッセイ

細胞毒性の定量化は、培地への LDH 放出を測定することによって行った。マスト細胞を $1 \times 10^6 \text{ cells}/\text{mL}$ の密度で播種し、MTM-ARF1 (8-16) ペプチドの存在下または非存在下で 0.5 時間または 3 時間培養し、培養上清をサンプルとした。LDH 活性は、細胞毒性 LDH アッセイキット-WST (Dojindo Laboratories, CK12) を用いて製造者のプロトコールに従って測定した。

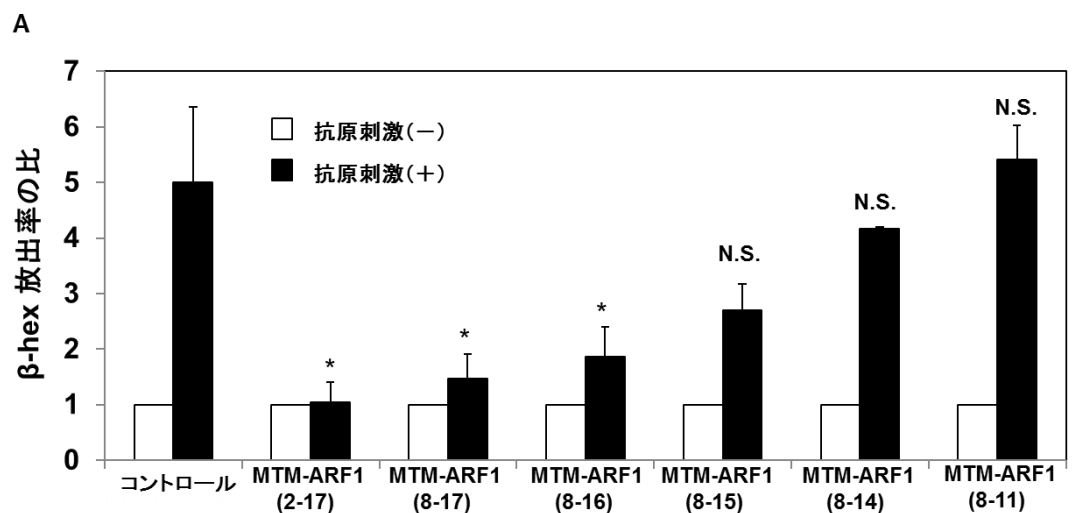
統計学的分析

統計解析ソフト IBM SPSS Statistics を用いて、Student の t 検定を行い、p 値が 0.05 未満の場合にデータは統計学的に有意であるとみなした。

結果

ARF1 ペプチドの脱顆粒阻害効果に重要な C 末端領域は 16 番目のリシンを含む配列である

マスト細胞脱顆粒の阻害に必要な MTM-ARF1 (2-17) における C 末端側の重要なアミノ酸配列を決定するために、図 2B に示すように C 末端側から段階的に欠失している ARF1 由来の各ペプチドを合成した。マスト細胞脱顆粒に対するこれらのペプチドの阻害活性を、脱顆粒に伴い放出される β -ヘキソサミニダーゼの活性を測定することによって調べた。先行研究[8]と一致して、MTM-ARF1 (2-17) は、FcεRI 誘導性マスト細胞脱顆粒の強い阻害作用を示した (図 2A)。また、先行研究[40]において ARF1 の阻害活性に関与していないことが示されている MTM-ARF1 (2-17) の G²-N⁷ 残基を欠く短縮型ペプチド MTM-ARF1 (8-17) においても、脱顆粒の阻害活性が示された (図 2A)。次いで、MTM-ARF1 (8-17) の C 末端の E¹⁷ を除去した場合においても阻害活性は保持された (図 2A)。E¹⁷ および K¹⁶ を欠失させた場合、有意差は見られなくなったが抑制傾向が見られ、E¹⁷ から K¹⁵ まで欠失させると阻害効果は完全に見られなくなった (図 1A)。これらのデータは、MTM-ARF1 (2-17) の K¹⁶ を含む配列がマスト細胞脱顆粒の阻害に重要であることを示した。



B

MTM-ARF1	ペプチド配列	脱顆粒阻害効果
MTM-ARF1(2-17)	AAVLLPVLLAAP - ² GNIFANLFKGLFGKKE ¹⁷	+
MTM-ARF1(8-17)	AAVLLPVLLAAP - LFKGLFGKKE	+
MTM-ARF1(8-16)	AAVLLPVLLAAP - LFKGLFGKK	+
MTM-ARF1(8-15)	AAVLLPVLLAAP - LFKGLFGK	-
MTM-ARF1(8-14)	AAVLLPVLLAAP - LFKGLFG	-
MTM-ARF1(8-11)	AAVLLPVLLAAP - LFKG	-

図 2. マスト細胞脱顆粒阻害効果に対する MTM-ARF1 の C 末端領域の欠失の影響

(A) マスト細胞脱顆粒に対する各 MTM-ARF1 ペプチドの阻害効果をグラフに示した。マスト細胞を 15 μ M の各ペプチドで 5 分間処理した後、抗原により 30 分間刺激した。次いで、マスト細胞脱顆粒を β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定することによって調べた。値は平均 \pm 標準偏差 (SD) を表す。統計解析は、Student の t 検定を用いて行った。N.S.: 有意ではない * : P < 0.05 (B) MTM-ARF1 の C 末端領域における合成ペプチドの構造活性相関を示した。ARF ペプチドのアミノ酸配列とマスト細胞脱顆粒に対する阻害効果との関係を示した。+ は p 値が 0.05 未満であり統計的に有意であることを示している。

ARF1 ペプチドのマスト細胞脱顆粒阻害効果とペプチド N 末端領域の関係

マスト細胞脱顆粒の阻害に重要な ARF1 ペプチドの N 末端側のアミノ酸残基を決定するために、ARF1 (7-16) の N 末端から段階的に欠失している各ペプチドを合成した (図 3B)。MTM-ARF1 (7-16) は、FcεRI 誘導性マスト細胞脱顆粒を完全に阻害した (図 3A)。MTM-ARF1 (7-16) の N 末端残基の N⁷、N⁷ および L⁸、または N⁷ から F⁹ が欠失した場合、マスト細胞の脱顆粒は有意に阻害された (図 3A)。しかしながら、N⁷ から K¹⁰ が欠失した MTM-ARF1 (11-16) は、阻害活性を示さなかった (図 3A)。この結果から、脱顆粒阻害活性に K¹⁰ を含む配列が重要であることが示された。また、C 末端側を調べた結果と合わせると、効果的なマスト細胞脱顆粒阻害活性には、K¹⁰、K¹⁶ を含む ARF1 (10-16) が重要であると考えられる。

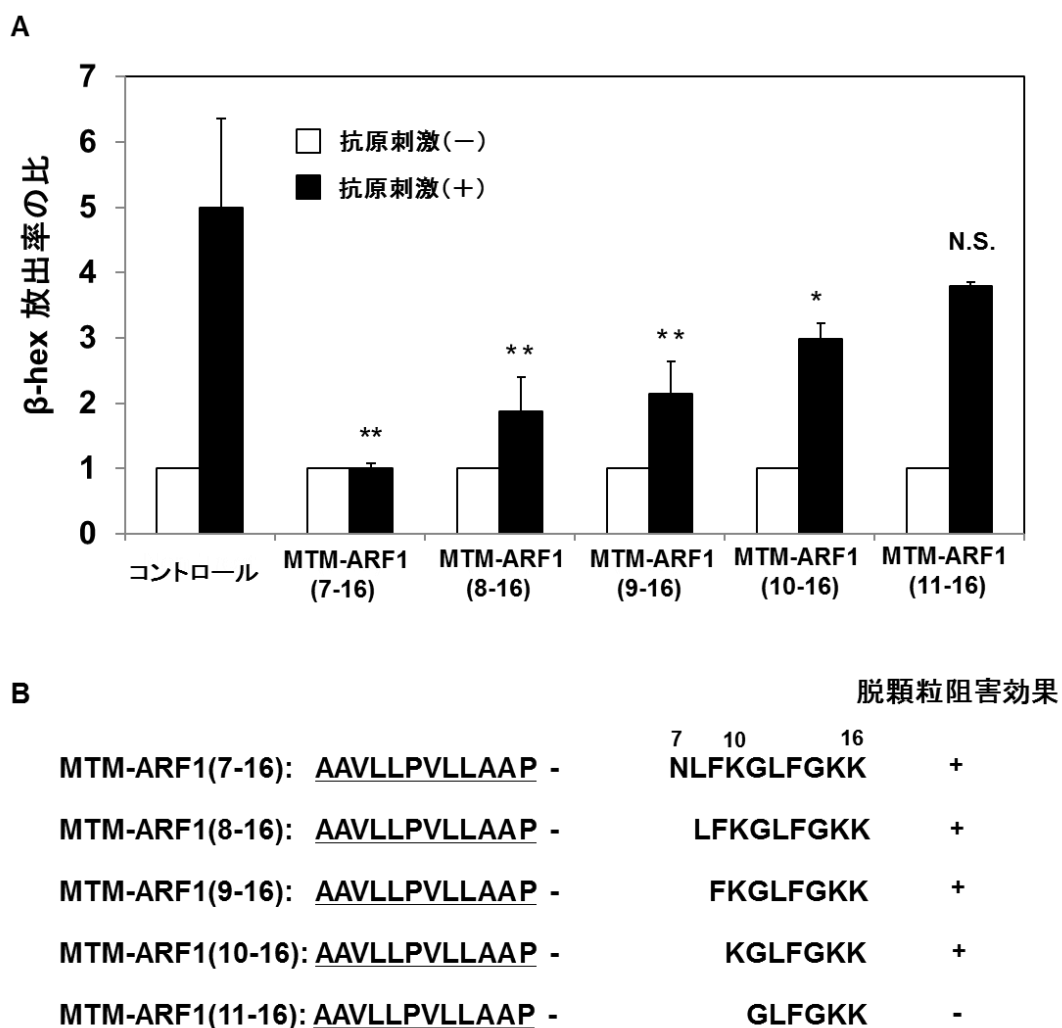


図 3. マスト細胞脱顆粒に対する MTM-ARF1 の N 末端領域の欠失の影響

(A) マスト細胞脱顆粒に対する各 MTM-ARF1 ペプチドの阻害効果をグラフに示した。マスト細胞を 15 μ M の各ペプチドで 5 分間処理した後、抗原により 30 分間刺激した。次いで、マスト細胞脱顆粒を β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定することによって調べた。値は平均 \pm 標準偏差 (SD) を表す。統計分析は、Student の t 検定を用いて行った。N.S.: 有意ではない、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ (B) MTM-ARF1 の N 末端領域における合成ペプチドの構造活性相関を示した。ARF ペプチドのアミノ酸配列とマスト細胞脱顆粒に対する阻害効果との関係を示した。+ は p 値が 0.05 未満であり統計的に有意であることを示している。

MTM-ARF1 ペプチドはマスト細胞のサイトカイン産生を阻害した

マスト細胞におけるサイトカイン産生に対する MTM-ARF1 (8-16) の効果を調べるために、FcεRI 刺激によって誘導された IL-6 のタンパク質発現量および mRNA 量を、ELISA およびリアルタイム PCR 分析によって調べた。図 4A に示すように、MTM-ARF1 (8-16) で処置したマスト細胞では FcεRI 刺激による IL-6 の増加が有意に抑制された。さらに、MTM-ARF1 (8-16) は、FcεRI 誘導性 IL-6 発現も阻害した (図 4B)。これらの結果は、MTM-ARF1 (8-16) が転写レベルで IL-6 産生を阻害することを示した。

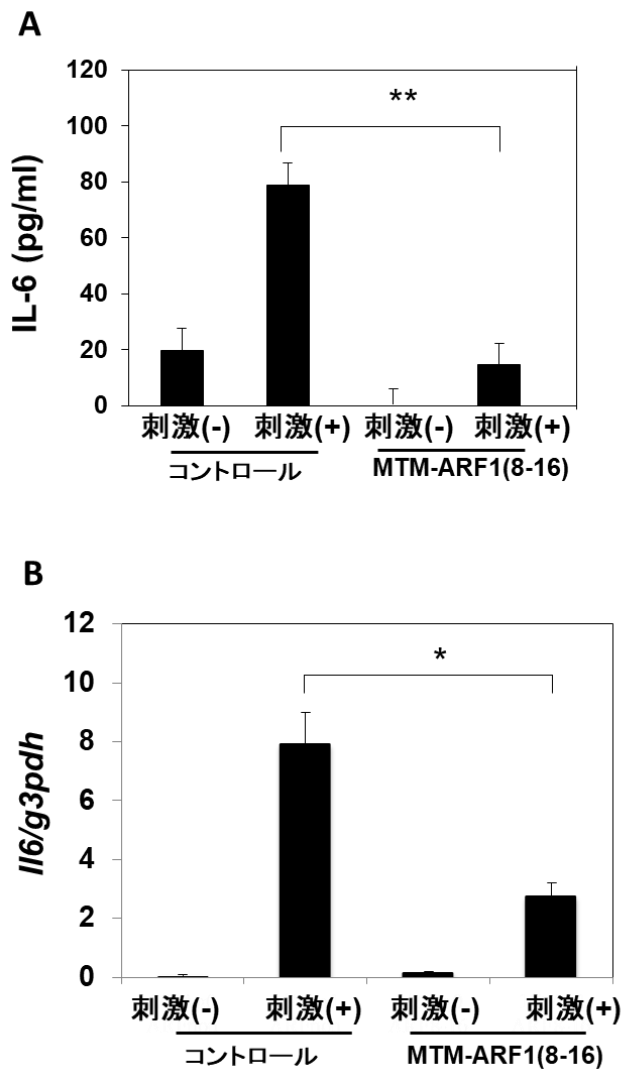


図 4. MTM-ARF1 のサイトカイン産生への影響

(A) IL-6 は、3 時間の FcεRI 刺激後にマスト細胞から培養上清中に放出された量を ELISA によって測定した。MTM-ARF1 (8-16) は 15 μM で処理した。値は平均±SD を表す。統計分析は、Student の t 検定を用いて行った。**, p < 0.01。 (B) FcεRI 媒介性の *I16* 転写誘導を見た。マスト細胞を 15 μM の MTM-ARF1 (8-16) ペプチドで 5 分間処理し、抗原刺激 30 分後に *I16* の mRNA を抽出した。*I16* の発現レベルは、リアルタイム PCR によって測定した。値は平均±SD を表す。統計解析は、Student の t 検定を用いて行った。*, p < 0.05

MTM-ARF1 ペプチドはマスト細胞の脂質メディエーター産生を阻害した

マスト細胞において FcεRI 刺激は、ロイコトリエン C₄ (LTC₄) のような脂質メディエーターの産生を誘導する。MTM-ARF1 (8-16) が FcεRI 誘導性 LTC₄ 産生を阻害するかどうかを調べるために、マスト細胞を ARF1 (8-16) で処理し、FcεRI 刺激した場合の LTC₄ 産生量の変化を ELISA によって測定した。その結果、LTC₄ 産生は MTM-ARF1 (8-16) 処理したマスト細胞で有意に減少した (図 5)。

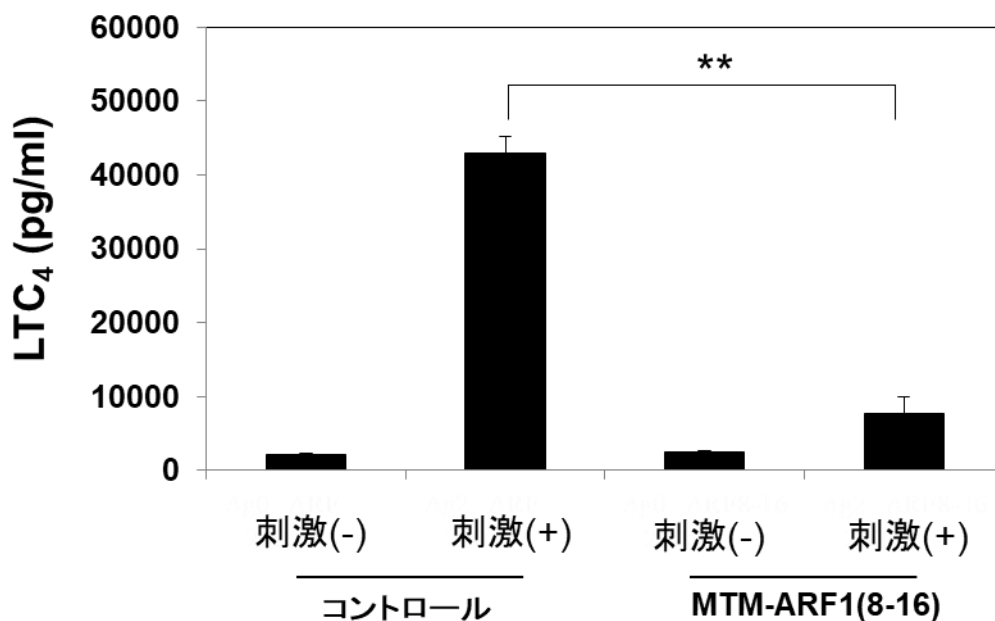


図 5. MTM-ARF1 の脂質メディエーター産生への影響

LTC₄ は、FcεRI 刺激の 30 分後に培養上清中に放出された量を測定した。細胞を 15 μM の MTM-ARF1 (8-16) で 5 分間処理し、次いで 30 分間刺激した。LTC₄ は、ELISA によって測定した。値は平均±SD を表す。統計解析は、Student の t 検定を用いて行った。
**, p < 0.01。

MTM-ARF1 ペプチドはアナフィラキシー反応を抑制した

生体内でのマスト細胞脱顆粒における MTM-ARF1 (8-16) の役割を明らかにするために、抗原特異的 IgE を耳に注入したマウス受動皮膚アナフィラキシー (PCA) モデルを用いてアレルギー反応における有効性を評価した。MTM-ARF1 (8-16) の腹腔内投与によるマウスの前処置は、抗原依存性 PCA 反応を有意に抑制した (図 6)。これらの結果は、MTM-ARF1 (8-16) が生体内で抗原依存性マスト細胞脱顆粒を効果的に阻害することを示している。

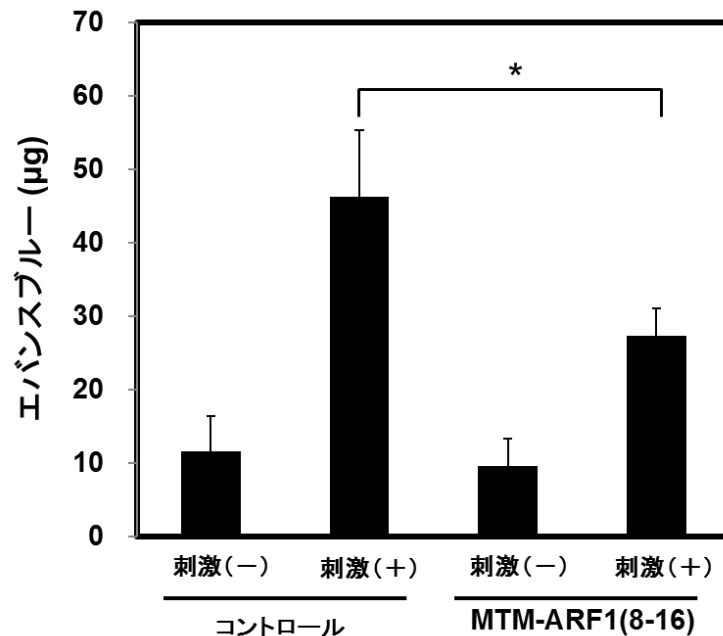


図 6. 抗原依存性受動皮膚アナフィラキシーモデルに対する ARF1 ペプチドの作用

生体内での MTM-ARF1 (8-16) ペプチドの効果、受動的皮膚アナフィラキシー (PCA) のマウスモデルを用いて試験した。マウスを耳に注射した IgE で感作し、抗原 (DNP-BSA) とエバンスブルーを静脈注射して、30 分間観察した。実験群は抗原曝露の前に、マウスに MTM-ARF1 (8-16) ペプチドを腹腔注射した。両耳における血管外漏出エバンスブルー色素の量は、色素を抽出し、620 nm で抽出物の吸光度を測定することによって決定した。データは、平均 ± SD として表す (一群当たり 3 匹のマウス)。統計解析は、Student の t 検定を用いて行った。* : $p < 0.05$ 。

考察

免疫学および分子生物学の分野における研究の進展に伴い、抗アレルギー薬によるアレルギー性炎症の抑制メカニズムの解明が進んでいる。しかし、アレルギー疾患はまだ完全には克服されておらず、より効果的な抗アレルギー薬の開発が望まれている。

第二章における一つ目の実験として、マスト細胞の $Fc\epsilon RI$ 依存性脱顆粒抑制効果を有する ARF1 ペプチドの構造活性相関の解析を行った。そして、ARF1 ペプチドがマスト細胞の脱顆粒を効率的に阻害するために ARF1(10-16)の配列が重要であることを示した。この結果から、ARF1 阻害作用のメカニズムとして以下のような仮説が考えられた。G タンパク質である ARF1 の活性化にはグアニンヌクレオチド交換タンパク質 (GEP) が必要であるが、GEP の活性化には PIP_3 が必要であることが示されている[42]。加えて、ARF1 は PIP_2 と相互作用することにより活性化が促されることが *in vitro* の実験により示されており[43]、マスト細胞においても同様に ARF1 の活性化に PIP_2 が必要であると考えられる。これらの報告から、ARF1 は脂質膜上の PIP_2 と相互作用し、同じく膜上に存在する PIP_3 によって活性化された GEP により活性化されるという流れが推測される。また、ARF1 ペプチドの脱顆粒阻害活性には塩基性アミノ酸である K^{10} 、 K^{15} 、 K^{16} を含む配列が重要であることが明らかとなったが、先行研究において ARF1 と PIP_2 の相互作用には ARF1 の N 末端側における K^{15} 、 K^{16} および C 末端側の R^{178} 、 K^{181} が重要であることが示されており[44]、N 末端側における類似性が見られる。これらの結果をもとに ARF1 ペプチドの作用機序を考えると、ARF1 ペプチドは PIP_2 に結合することで ARF1 の PIP_2 との結合を競合的に阻害し、その活性化を妨げている可能性が挙げられる。

第二章の二つ目の実験として、マスト細胞における $Fc\epsilon RI$ 依存性サイトカイン産生および、脂質メディエーター産生への ARF1 ペプチドの影響を調べた。その結果、ARF1 ペプチドは脱顆粒のみならずサイトカイン産生および脂質メディエーターの産生も阻害するこ

とが明らかとなった。ARF1 は PI-3K/Akt 経路の活性化に関与していることが示されている[45]。また、Akt はサイトカイン転写因子の活性化に関与していることが知られている。このことから、ARF1 ペプチドによる ARF1 の阻害が Akt の活性化を妨げ、サイトカイン産生を抑制したと考えられる。一方、脂質メディエーターの産生はアラキドン酸から開始されるが、アラキドン酸のリン脂質膜からの遊離はホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) によって行われている。そして、PLA₂ の活性化には PIP₂ との結合が必要であることが示されている[46]。このことから、ARF1 ペプチドによって PIP₂ と PLA₂ との結合が妨げられ、脂質メディエーターの産生を抑制したと考えられる。

第二章の三つ目の実験として、ARF1 ペプチドの抗アレルギー効果を検討するためにマウスのアナフィラキシーモデルを用いてアナフィラキシー反応抑制効果を調べた。その結果、アナフィラキシー反応の有意な抑制効果が見られ、抗アレルギー効果を有することが示された。この結果から、ARF1 が抗アレルギー薬としての新たな標的となり得る可能性が示唆された。

小括

第二章では、ARF1 ペプチドのマスト細胞活性化への影響について述べた。マスト細胞において ARF1 は脱顆粒に関与していることが示されており、また、ARF1 の N 末端ペプチドである ARF1(2-17)には脱顆粒を抑制する作用があることが報告されていた。第二章の研究において、ARF1 ペプチドの脱顆粒抑制効果における重要なアミノ酸配列は ARF1(10-16)であることが示された。また、ARF1 ペプチドは脱顆粒のみならず、サイトカイン産生および脂質メディエーターの産生を抑制した。さらに、マウスを用いたアナフィラキシーモデルにおいて、ARF1 ペプチドがアナフィラキシーを抑制することが示された。これらの結果は ARF1 が抗アレルギー薬の新たな標的となり得る可能性を提示した。

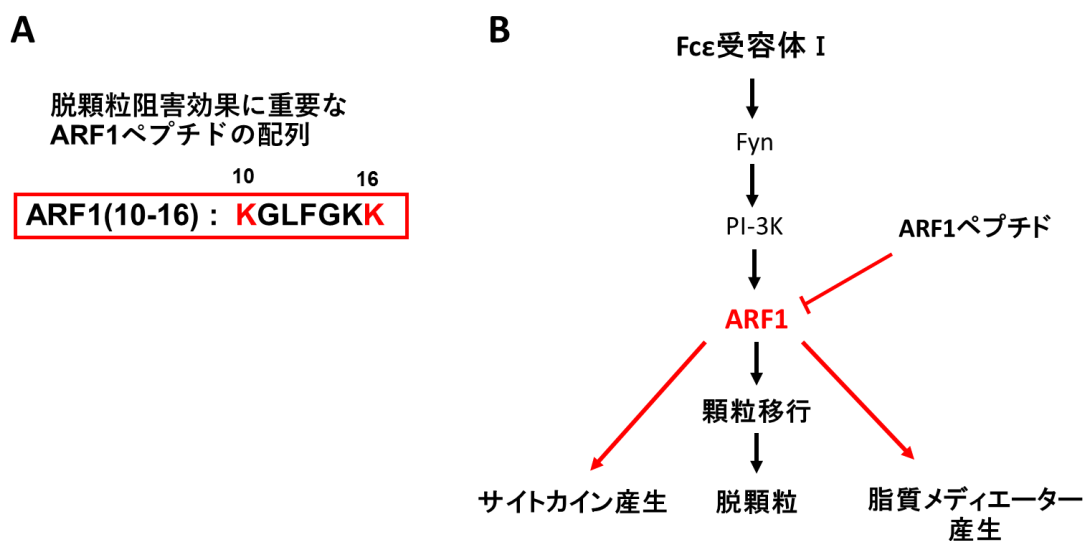


図 7. マスト細胞における ARF1 ペプチドの活性化阻害効果

ARF1 ペプチドは ARF1 を阻害することが報告されているが、マスト細胞においては脱顆粒を阻害することが示されている。今回、ARF1 ペプチドの脱顆粒阻害作用に重要なアミノ酸配列は ARF1(10-16)であることが示された (A)。また、ARF1 は脱顆粒のみならずサイトカイン産生および脂質メディエーターの産生も阻害することが示された (B)。

結語

本研究では、アレルギーの制御を目的としてマスト細胞の活性化機構に着目して解明を試みた。マスト細胞は寄生虫やアレルゲンの侵入によって活性化し、脱顆粒や脂質メディエーターの産生を行うことで炎症反応を起こす。また、サイトカインを産生することにより、生体の異常を周囲の細胞へ伝えて防御機能を活性化させる。しかし、無害な抗原への過剰な応答は生体にとって不都合となり得る。そこで、マスト細胞の活性化制御が重要となってくる。第一章では、マスト細胞のサイトカイン転写活性化経路において重要となる亜鉛ウェーブが、マスト細胞のみならずサイトカインを産生する様々な細胞において存在する普遍的なシグナル経路である可能性が示唆された。また、亜鉛ウェーブの制御分子である L 型カルシウムチャネルを遮断することにより生体における抗原刺激依存的なサイトカインの産生の抑制効果が見られた。このことから、亜鉛ウェーブ経路は新たな抗アレルギー薬のターゲットとなる可能性が示された。第二章では、マスト細胞の脱顆粒に重要とされている ARF1 の特異的阻害剤である ARF1 ペプチドの抗アレルギー効果について検討を行った。その結果、ARF1 ペプチドによる脱顆粒の抑制効果において、特に K¹⁰、K¹⁵、K¹⁶ が重要であることが明らかとなり、ARF1 ペプチドの作用機序解明の手がかりが得られた。また、ARF1 は脱顆粒のみならず、サイトカイン産生や脂質メディエーター産生にも関与していることが示された。加えて、生体における抗アレルギー効果が示されたため、ARF1 は抗アレルギー薬の新たな標的となる可能性が示された。

以上より、本研究によってマスト細胞の活性化制御機構に関して新たな知見が得られ、これはアレルギー疾患の制御に繋がる成果であると考えられる。

引用文献

1. Turner, H. and J.P. Kinet, Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature*, 1999. **402**(6760 Suppl): p. B24-30.
2. da Silva, E.Z., M.C. Jamur, and C. Oliver, Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem*, 2014. **62**(10): p. 698-738.
3. Beaven, M.A., Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(1): p. 11-25.
4. Galli, S.J. and M. Tsai, IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med*, 2012. **18**(5): p. 693-704.
5. Kawakami, T., et al., Mast cells in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(6): p. 666-78.
6. Gilfillan, A.M. and J. Rivera, The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev*, 2009. **228**(1): p. 149-69.
7. Yamasaki, S., et al., Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol*, 2007. **177**(4): p. 637-45.
8. Nishida, K., et al., Gab2, via PI-3K, regulates ARF1 in FcepsilonRI-mediated granule translocation and mast cell degranulation. *J Immunol*, 2011. **187**(2): p. 932-41.
9. Cousins, R.J., J.P. Liuzzi, and L.A. Lichten, Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem*, 2006. **281**(34): p. 24085-9.
10. Fukada, T. and T. Kambe, Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics*, 2011. **3**(7): p. 662-74.
11. Kimura, T. and T. Kambe, The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(3): p. 336.
12. Inoue, K., Z. O'Bryant, and Z.G. Xiong, Zinc-permeable ion channels: effects on intracellular zinc dynamics and potential physiological/pathophysiological significance. *Curr Med Chem*, 2015. **22**(10): p. 1248-57.
13. Hara, T., et al., Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci*, 2017. **67**(2): p. 283-301.
14. Kambe, T., et al., Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(1): p. 49-68.
15. Weiss, J.H. and S.L. Sensi, Ca²⁺-Zn²⁺ permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 2000. **23**(8): p. 365-71.

16. Hirano, T., et al., Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule. *Adv Immunol*, 2008. **97**: p. 149-76.
17. Murakami, M. and T. Hirano, Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Sci*, 2008. **99**(8): p. 1515-22.
18. Fukada, T., et al., Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem*, 2011. **16**(7): p. 1123-34.
19. Maywald, M., I. Wessels, and L. Rink, Zinc Signals and Immunity. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(10).
20. Nishida K, F.T., Yamasaki S, Murakami M, Hirano T., Zinc in allergy, autoimmune, and hard and connective tissue diseases. 2011: IOS Press.
21. Nishida K, Y.S., Zinc Signals in Cellular Functions and Disorders. Springer. 2014.
22. Yu, M., et al., Regulation of T cell receptor signaling by activation-induced zinc influx. *J Exp Med*, 2011. **208**(4): p. 775-85.
23. Atar, D., et al., Excitation-transcription coupling mediated by zinc influx through voltage-dependent calcium channels. *J Biol Chem*, 1995. **270**(6): p. 2473-7.
24. Yamakage, M. and A. Namiki, Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth*, 2002. **49**(2): p. 151-64.
25. Kahn, R.A. and A.G. Gilman, The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem*, 1986. **261**(17): p. 7906-11.
26. Roth, M.G., Snapshots of ARF1: implications for mechanisms of activation and inactivation. *Cell*, 1999. **97**(2): p. 149-52.
27. Moss, J. and M. Vaughan, Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J Biol Chem*, 1995. **270**(21): p. 12327-30.
28. Donaldson, J.G. and C.L. Jackson, ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(6): p. 362-75.
29. Nie, Z., D.S. Hirsch, and P.A. Randazzo, Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(4): p. 396-404.
30. Spang, A., ARF1 regulatory factors and COPI vesicle formation. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. **14**(4): p. 423-7.
31. Donaldson, J.G., Phospholipase D in endocytosis and endosomal recycling pathways. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1791**(9): p. 845-9.

32. Haines, E., S. Schlienger, and A. Claing, The small GTPase ADP-Ribosylation Factor 1 mediates the sensitivity of triple negative breast cancer cells to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Biol Ther*, 2015. **16**(10): p. 1535-47.
33. Lewis-Saravalli, S., S. Campbell, and A. Claing, ARF1 controls Rac1 signaling to regulate migration of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells. *Cell Signal*, 2013. **25**(9): p. 1813-9.
34. Yamasaki, S., et al., A novel role of the L-type calcium channel alpha1D subunit as a gatekeeper for intracellular zinc signaling: zinc wave. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e39654.
35. McCurdy, J.D., T.J. Lin, and J.S. Marshall, Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J Leukoc Biol*, 2001. **70**(6): p. 977-84.
36. Cherry, W.B., et al., A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **121**(6): p. 1484-90.
37. Schmitz, J., et al., IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 2005. **23**(5): p. 479-90.
38. Morita, H., et al., An interleukin-33-mast cell-interleukin-2 axis suppresses papain-induced allergic inflammation by promoting regulatory T cell numbers. *Immunity*, 2015. **43**(1): p. 175-86.
39. McAlpine, S.M., et al., The effect of bacterial, viral and fungal infection on mast cell reactivity in the allergic setting. *J Innate Immun*, 2011. **3**(2): p. 120-30.
40. Kahn, R.A., et al., The amino terminus of ADP-ribosylation factor (ARF) is a critical determinant of ARF activities and is a potent and specific inhibitor of protein transport. *J Biol Chem*, 1992. **267**(18): p. 13039-46.
41. Jo, D., et al., Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat Med*, 2005. **11**(8): p. 892-8.
42. Klarlund, J.K., et al., Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science*, 1997. **275**(5308): p. 1927-30.
43. Terui, T., R.A. Kahn, and P.A. Randazzo, Effects of acid phospholipids on nucleotide exchange properties of ADP-ribosylation factor 1. Evidence for specific interaction with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem*, 1994. **269**(45): p. 28130-5.
44. Randazzo, P.A., Functional interaction of ADP-ribosylation factor 1 with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem*, 1997. **272**(12): p. 7688-92.

45. Boulay, P.L., et al., ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2008. **283**(52): p. 36425-34.
46. Casas, J., et al., Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate anchors cytosolic group IVA phospholipase A2 to perinuclear membranes and decreases its calcium requirement for translocation in live cells. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(1): p. 155-62.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科 西田 圭吾 准教授に深く尊敬と感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、ご協力をいただいた鈴鹿医療科学大学薬学部 田口 博明 教授ならびに藤田 快男 助教、京都薬科大学病態薬科学系薬理学分野 田中 智之 教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 古田 和幸 准教授、北海道大学遺伝子病制御研究所 北村 秀光 准教授ならびに項 慧慧 博士に深く感謝致します。また、大学院在学中、共に研究を実施していただいた江川 智徳 氏、新井 裕也 氏をはじめとする鈴鹿医療科学大学薬学部免疫制御学研究室の皆様、論文の英文校正をサポートしていただいた加藤 美智子 博士に感謝いたします。

研究生生活において親身になって様々なご助力をいただき、お世話になりました鈴鹿医療科学大学薬学部 鈴木 宏治 教授に深く感謝致します。

本研究の審査にあたり、ご指導、ご助言を賜りました、鈴鹿医療科学大学薬学部 定金 豊 教授、佐藤 英介 教授、坂 晋 助教に深く感謝致します。

研究生生活を送るにあたり技術的・精神的に支えていただきました鈴鹿医療科学大学薬理系研究室の古川 絢子 助教、及川 弘崇 助教、薬学部の先生方ならびに、事務面で大変お世話になった大学院担当の水井 智子 氏をはじめ鈴鹿医療科学大学の職員の方々に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金ならびに公益財団法人
つくし奨学・研究基金の支援をいただき、謹んで感謝申し上げます。

Molecular mechanisms of mast cell activation in allergic reactions
- Role of zinc wave and ARF1-mediated regulatory mechanism -

Introduction

Mast cells are immunocompetent cells widely distributed in subcutaneous tissues and mucosal tissues and are responsible for biological defense by releasing various inflammatory substances. Immunoglobulin E (IgE) antibodies are produced in plasma cells when parasitic invasion occurs, and the produced IgE antibody binds to Fcε receptor I (FcεRI) on the membrane of mast cells. When FcεRI is crosslinked by antigen-IgE complex, inflammatory reactions such as degranulation and cytokine production occur [1].

Toll-like receptors and cytokine receptors are also expressed on the surface of mast cells, and they are activated in response to LPS and cytokine stimulation, resulting in inflammatory reactions [2]. While these receptors have an important role in host defense, they may also respond excessively to innocuous antigens such as pollens and dead mites and can cause allergic diseases like pollinosis, asthma and atopic dermatitis [2]. Therefore, elucidating the regulatory mechanism of mast cell activation is important. Recent studies have shown that zinc (Zn) ion can behave as an intracellular signaling molecule and that Zn is involved in mast cell activation [3]. In addition, it was reported that a peptide fragment derived from the small G protein ARF1 (ADP-ribosylation factor 1) has an ability to suppress mast cell degranulation [4]. In this study, the role of zinc wave in the regulation of cytokine production (Chapter 1), and the regulation of mast cell activation by ARF1 peptide (Chapter 2) were investigated.

Chapter 1: Role of zinc wave in the regulation of inflammatory cytokine production.

In mast cells, a phenomenon called "zinc wave" in which cytoplasmic zinc concentration rapidly rises in an antigen stimulation-dependent manner is known to occur [5]. Zinc wave is observed within several minutes after IgE stimulation, and the intracellular zinc concentration reaches a peak in approximately 15 minutes after which it starts to decline. It is also known that zinc wave originates from the endoplasmic reticulum (ER) and is regulated by L-type calcium channel (LTCC) on the ER membrane [6]. Production of cytokines in mast cells can be either IgE-mediated or non-IgE-mediated, but it has not been clear whether LTCC-mediated zinc wave in mast cells is caused by a non-IgE-mediated stimulation as well. In addition, LTCC-mediated zinc wave has not been

observed in immune cells other than mast cells. Therefore, we examined the possibility that zinc wave is involved in signaling pathways other than antigen receptor-mediated pathway. First, we investigated whether increase in cytoplasmic zinc concentration is caused by LPS or IL-33 stimulation using a zinc fluorescent probe. With all stimuli tested, a significant increase in fluorescence intensity was observed 30 minutes after stimulation, and this increase was suppressed by the LTCC blocker nicardipine. We also examined the effects of nicardipine and a zinc chelator *N, N, N', N'*-Tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) on *IL-6* transcription induced by LPS and IL-33. The result showed that the transcription rate was significantly suppressed by nicardipine and TPEN. These results revealed that zinc wave is also involved in the activation pathways by LPS and cytokines in mast cells. It is also possible that zinc wave is involved in the activation of cells of innate immunity since LPS activates these cells, in addition to mast cells, to induce cytokine production. Therefore, we investigated whether zinc wave is involved in cytokine production in dendritic cells, one of the innate immune cells. Zinc wave was also observed when dendritic cells were stimulated with LPS. This suggests that zinc wave is not only involved in the mast cell-specific signaling pathways but may also be part of the universal signal regulation mechanism in the cytokine transcription pathways.

Chapter 2: Investigation of the regulatory mechanism of mast cell activation using ARF1 peptide.

ARF1 is a small G protein belonging to the Ras superfamily, and it has been shown to have variety of roles in cells such as cytoskeletal regulation, membrane trafficking, and phospholipid metabolism. In addition, ARF1 has been reported to be involved in degranulation in mast cells. MTM-ARF1(2-17) (hereafter called “ARF1 peptide”), a cell-permeable fusion peptide in which a membrane translocating motif (MTM) is fused to a short N-terminal sequence corresponding to residues 2-17 of ARF1, has been shown to inhibit the FcεRI-induced ARF1 activation and mast cell degranulation [4]. Therefore, we investigated the effect of ARF1 peptide on mast cell activation. First, we examined the amino acid sequence of ARF1 peptide important for the suppression of degranulation by deleting amino acids from the C-terminal and/or the N-terminal in a sequential manner in order to investigate the structure-activity relationship relative to the suppression of degranulation. The result showed that the sequence containing lysine at the 10th and 16th positions of the ARF1 peptide is important for the suppression of mast cell degranulation activity. Next, we investigated the effect of mast cells on cytokine

production and lipid mediator production using the ARF1 peptide. The result showed that the ARF1 peptide inhibited cytokine production and lipid mediator production. These results indicated that ARF1 is involved not only in degranulation but also on cytokine production and lipid mediator production. Furthermore, the effect of the ARF1 peptide on anaphylactic reaction using a mouse anaphylaxis model was examined to investigate the anti-allergic effect of the ARF1 peptide. The ARF1 peptide suppressed the anaphylactic reaction in mice, suggesting the possibility of drug discovery targeting ARF1.

Overall, these studies suggested that the mechanism of zinc wave is a universal mechanism in the regulation of cytokine gene expression. We have also discovered a role of ARF1 signaling pathway in mast cell activation mechanism.

References

1. Turner, H. and J.P. Kinet, Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature*, 1999. 402(6760 Suppl): p. B24-30.
2. da Silva, E.Z., M.C. Jamur, and C. Oliver, Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem*, 2014. 62(10): p. 698-738.
3. Nishida, K. and R. Uchida, Regulatory Mechanism of Mast Cell Activation by Zinc Signaling. *Yakugaku Zasshi*, 2017. 137(5): p. 495-501.
4. Nishida, K., et al., Gab2, via PI-3K, regulates ARF1 in FcepsilonRI-mediated granule translocation and mast cell degranulation. *J Immunol*, 2011. 187(2): p. 932-41.
5. Yamasaki, S., et al., Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol*, 2007. 177(4): p. 637-45.
6. Yamasaki, S., et al., A novel role of the L-type calcium channel alpha1D subunit as a gatekeeper for intracellular zinc signaling: zinc wave. *PLoS One*, 2012. 7(6): p. e39654.